

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-83546  
(P2004-83546A)

(43) 公開日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>C07K 14/46  
C07K 1/30

F 1

C07K 14/46  
C07K 1/30

テーマコード(参考)

4H045

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2002-320425 (P2002-320425)  
 (22) 出願日 平成14年11月1日 (2002.11.1)  
 (31) 優先権主張番号 特願2001-356709 (P2001-356709)  
 (32) 優先日 平成13年11月21日 (2001.11.21)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)  
 (31) 優先権主張番号 特願2002-104477 (P2002-104477)  
 (32) 優先日 平成14年4月5日 (2002.4.5)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)  
 (31) 優先権主張番号 特願2002-192339 (P2002-192339)  
 (32) 優先日 平成14年7月1日 (2002.7.1)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 301021533  
 独立行政法人産業技術総合研究所  
 東京都千代田区霞が関1-3-1  
 (72) 発明者 津田 栄  
 札幌市豊平区月寒東2条17-2-1 独  
 立行政法人産業技術総合研究所北海道セン  
 ター内  
 (72) 発明者 三浦 愛  
 札幌市豊平区月寒東2条17-2-1 独  
 立行政法人産業技術総合研究所北海道セン  
 ター内  
 Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 CA52 EA01 GA06  
 GA22 GA23 GA25

(54) 【発明の名称】魚類由来の不凍タンパク質

## (57) 【要約】

【課題】不凍タンパク質を容易に入手可能な魚種から採取し、不凍タンパク質の利用促進を図る。

【課題解決手段】日本国内、日本近海水域、あるいは該水域と同等気候域の水域に生息する魚種、特に、ギスカジカ属、ツマグロカジカ属、ヨコスジカジカ属、サラサカジカ属、ワカサギ属、シシャモ属、カラフトシシャモ属、ホッケ属、メバル属、ニシン属、マコガレイ属、クロガレイ属、サメガレイ属、ソウハチ属、ババガレイ属、シュムシュガレイ属、ヌマガレイ属、イシガレイ属、ムシガレイ属、マダラ属、スケトウダラ属、イカナゴ属、シワイカナゴ属、マアジ属、シチロウウオ属、ニシキギンポ属、オキカズナギ属、ナガガジ属、ドロギンポ属、ムロランギンポ属から選ばれた魚種から不凍タンパク質を得る。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

日本国内またはその周辺の水域、若しくは該水域と同等気候の水域に生息する魚種から採取されたものであって、凍結を阻害する機能を有するタンパク質。

## 【請求項 2】

タンパク質の採取源がギスカジカ属 (*Myoxocephalus*)、ツマグロカジカ属 (*Gymnophanths*)、ヨコスジカジカ属 (*Hemilepidotus*)、サラサカジカ属 (*Furcina*)、ワカサギ属 (*Hypomesus*)、シシャモ属 (*Spirinchus*)、カラフトシシャモ属 (*Mallotus*)、ホッケ属 (*Pleuragrammus*)、メバル属 (*Sebastes*)、ニシン属 (*Clupea*)、マコガレイ属 (*Limanda*)、クロガレイ属 (*Liopsetta*)、サメガレイ属 (*Cliododerma*)、ソウハチ属 (*Cleisthenes*)、ババガレイ属 (*Microstomus*)、シュムシュガレイ属 (*Lepidopsetta*)、ヌマガレイ属 (*Platichthys*)、イシガレイ属 (*Kareius*)、ムシガレイ属 (*Eopsetta*)、マダラ属 (*Gadus*)、スケトウダラ属 (*Theragra*)、イカナゴ属 (*Ammodytes*)、シワイカナゴ属 (*Hypoptychus*)、マアジ属 (*Trachurus*)、シチロウウオ属 (*Brachyopsis*)、ニシキギンポ属 (*Pholis*)、オキカズナギ属 (*Opiosthocentrus*)、ナガガジ属 (*Zoarcies*)、ドロギンポ属 (*Ascoldia*)、またはムロランギンポ属 (*Pholidapus*) に属する魚種である請求項 1 に記載のタンパク質。  
10

20

## 【請求項 3】

タンパク質の採取源が、ギスカジカ (*Myoxocephalus stelleri tilesii*)、ツマグロカジカ (*Gymnophanths herzensteini* Jordan et Starks)、トゲカジカ (*Myoxocephalus polyacanthocephalus* (Pallas))、ナメヨコスジカジカ (*Hemilepidotus jordani* Bean)、キヌカジカ (*Furcina osimae* Jordan et Starks)、チカ (*Hypomesus pretiosus* *japonicus* (Brevoort))、イシカリワカサギ (*Hypomesus olidus* (Dallas))、シシャモ (*Spirinchus lanceolatus* (Hikita))、カラフトシシャモ (*Mallotus villosus* (Muller))、キタノホッケ (*Pleuragrammus monopterygius* (Pallas))、ヤナギノマイ (*Sebastes steindachneri* Hildendorf)、ニシン (*Clupea pallasi* Valenciennes)、マガレイ (*Limanda herzensteini* Jordan et Snyder)、スナガレイ (*Limanda punctatissima* (Steindachner))、クロガシラガレイ (*Limanda schrenkii* Schmidt)、コガネガレイ (*Limanda aspera* (Pallas))、クロガレイ (*Liopsetta obscura* (Herzenstein))、サメガレイ (*Cliododerma asperrum* (Temminck et Schlegel))、ソウハチ (*Cleisthenes pinetorum* *herzensteini* (Schmidt))、ババガレイ (*Microstomus achne* (Jordan et Starks))、アサバガレイ (*Lepidopsetta mochigarei* Snyder)、ヌマガレイ (*Platichthysstellatus* (Pallas))、イシガレイ (*Kareius bicoloratus* (Basilowsky))、ムシガレイ (*Eopsetta grigorjewi* (Herzenstein))、マダラ (*Gadus macrocephalus* *Tilesius*)、スケトウダラ (*Theragra chalcogramma* (Pallas))、イカナゴ (*Ammodytes personatus* Girard)、シワイカナゴ (*Hypoptychus dybowskii* Steindachner)、マアジ (*Tr*  
30  
40  
50

*achurus japonicus* (Temminck et Schlegel)）、シチロウウオ (*Brachyopsis rostratus* (Tilesius))、ニシキギンポ (*Pholis picta* (Kner))、ガジ (*Opisthocentrus ocellatus* (Tilesius))、ナガガジ (*Zoarces elongatus* Kner)、ドロギンポ (*Ascodia variegata knipowitschi Soldatov*)、またはムロランギンポ (*Pholidapus dybowskii* (Steindachner)) に属する魚種である請求項2に記載のタンパク質。

#### 【請求項4】

魚体乾物から得られたものである、請求項1～3のいずれかに記載のタンパク質。 10

#### 【請求項5】

不凍タンパク質の採取源となる魚体の臭いを除去しながら不凍タンパク質を回収する方法であって、下記1)～5)の工程を含むことを特徴とする不凍タンパク質の回収方法。

- 1) 魚体すり身または魚体乾物粉碎物の懸濁液を調製する工程。
- 2) 魚体すり身または魚体乾物粉碎物の懸濁液を遠心分離し、上澄液を得る工程。
- 3) 上澄液を加熱処理する工程。
- 4) 3)により生じた沈殿物を遠心分離により除去して不凍タンパク質を含有する上澄液を得る工程。
- 5) 4)で得られた上澄液から不凍タンパク質を回収する工程。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、日本国内またはその周辺の水域、若しくは該水域と同等気候の水域に生息する魚類から採取されたものであって、凍結を阻害する機能を有するタンパク質に関するものであり、特に、ギスカジカ属 (*Myoxocephalus*)、ツマグロカジカ属 (*Gymnophanthis*)、ヨコスジカジカ属 (*Hemilepidotus*)、サラサカジカ属 (*Furcina*)、ワカサギ属 (*Hypomesus*)、シシャモ属 (*Spirinchus*)、カラフトシシャモ属 (*Mallotus*)、ホッケ属 (*Pleurongrammus*)、メバル属 (*Sebastes*)、ニシン属 (*Clupea*)、マコガレイ属 (*Limanda*)、クロガレイ属 (*Liosetta*)、サメガレイ属 (*Cleidoderrma*)、ソウハチ属 (*Cleisthenes*)、ババガレイ属 (*Microstomus*)、シュムシュガレイ属 (*Lepidopsetta*)、ヌマガレイ属 (*Platichthys*)、イシガレイ属 (*Kareius*)、ムシガレイ属 (*Eopsetta*)、マダラ属 (*Gadus*)、スケトウダラ属 (*Theragra*)、イカナゴ属 (*Ammodytes*)、シワイカナゴ属 (*Hoplostethus*)、マアジ属 (*Trachurus*)、シチロウウオ属 (*Brachyopsis*)、ニシキギンポ属 (*Pholis*)、オキカズナギ属 (*Opisthocentrus*)、ナガガジ属 (*Zoarces*)、ドロギンポ属 (*Ascodia*)、またはムロランギンポ属 (*Pholidapus*) に属する不凍タンパク質產生魚種から得られるものであり、さらに具体的にはギスカジカ (*Myoxocephalus stelleri* Tilesius)、ツマグロカジカ (*Gymnophanthis herzensteini* Jordan et Starks)、トゲカジカ (*Myoxocephalus polyacanthocephalus* (Pallas))、ナメヨコスジカジカ (*Hemilepidotus jordani* Bean)、キヌカジカ (*Furcina osimae* Jordan et Starks)、チカ (*Hypomesus pretiosus* *japonicus* (Brevoort))、イシカリワカサギ (*Hypomesus olidus* (Dallas))、シシャモ (*Spirinchus lanceolatus* (Hikita))、カラフトシシャモ (*Mallotus villosus* (Muller))、キタノホッケ (*Pleurongrammus monopterygius* (Pallas))、ヤナギノマイ (*Sebastes steind* 40

achsneri Hilgendorf)、ニシン (*Clupea pallasii* Valenciennes)、マガレイ (*Limanda herzensteini* Jordan et Snyder)、スナガレイ (*Limanda punctatissima* (Steindachner))、クロガシラガレイ (*Limanda schrenkii* Schmidt)、コガネガレイ (*Limanda aspera* (Pallas))、クロガレイ (*Liopsetta obscura* (Herzenstein))、サメガレイ (*Cliododerma asperriatum* (Temminck et Schlegel))、ゾウハチ (*Cleisthenes pinetorum* herzensteini (Schmidt))、ババガレイ (*Microctomus achne* (Jordan et Starks))、アサバガレイ (*Lepidopsetta mochigarei* Snyder)、ヌマガレイ (*Platichthys stellatus* (Pallas))、イシガレイ (*Kareius bicoloratus* (Basilewsky))、ムシガレイ (*Eopsetta grigorjewi* (Herzenstein))、マダラ (*Gadus macrocephalus* Tilesius)、スケトウダラ (*Theragra chalcogramma* (Pallas))、イカナゴ (*Ammodytes personatus* Girard)、シワイカナゴ (*Hypoptychus dybowskii* Steindachner)、マアジ (*Trachurus japonicus* (Temminck et Schlegel))、シチロウウオ (*Brachyopsis rostratus* (Tilesius))、ニシキギンポ (*Pholis picta* (Kner))、ガジ (*Opisthocentrus ocellatus* (Tilesius))、ナガガジ (*Zoarces elongatus* Kner)、ドロギンポ (*Ascodia variegata knipowitschi* Soldatov)、またはムロランギンポ (*Pholidapus dybowskii* (Steindachner))に属する魚種から得られる不凍タンパク質に関する。

#### 【0002】

#### 【従来の技術】

これまで北極海や南極海、北米沖などで漁獲される魚類の組織液（血液）から、凍結寸前状態において組織液中に生成する無数の小さい氷結晶の表面に特異的に結合しダイヤモンド型に変形することで凍結を阻害し、その結果としてこのタンパク質を含む水溶液の見かけの凝固点を降下させる働きをもつ不凍タンパク質 (Anti freeze Protein、略称 AFP) とよばれるタンパク質がみつかっている。その魚類とは、タラ (タイセイヨウダラ、英名: Atlantic cod (*Gadus morhua* Linnaeus))、カレイ (プセウドプレウロネクテス アメリカヌス、英名: Winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum)))、ニシン (タイセイヨウニシン、英名: Atlantic herring (*Clupea harengus* Linnaeus))、キュウリウオ (キュウリウオ、英名: Rainbow smelt (*Osmerus mordax dentex* Steindachner))、カジカ (ミオクソケファルススコルピウス、英名: Shorthorn Sculpin (*Myoxocephalus scorpius* (Linnaeus))、マクロゾアルケルスアメリカヌス (*Macrozoarces americanus* (Block et Schneider))、ミオクソケファルスオクトデケンスピノスス、英名: Longhorn Sculpin (*Myoxocephalus octodecemspinosis* (Mitschilli))、ヘミトリプテルス アメリカヌス、英名: Atlantic sea raven (*Hemitripterus americanus* (Gmelin)))などである (Fletcher, G. L., Hew, C. L., and Davies, P. L. Ann. Rev. Physiol. (2001) 63, 359-390.)。このように、不凍タンパク質は限られた魚種について

10

20

30

40

40

50

て見いだされているにすぎず、また上記の魚種の殆どは日本では得られない種類であり、地球上に存在する2万種類以上もの膨大な魚種について不凍タンパク質の存在が十分に探索されているとはいひ難い。

### 【0003】

一方、不凍タンパク質は魚類以外にもニンジンやダイコン、キャベツなどの冬野菜および甲虫や蛾の幼虫の体液にも存在することが知られている。植物から抽出される不凍タンパク質は魚類由来のものにくらべて氷結晶結合能力が著しく弱い。不凍タンパク質は氷の再結晶化を妨げるはたらきがあるため例えればアイスクリームなどに混入することによりその品質を持続させると考えられる。より効率的に再結晶化を妨げるためにはより強力な氷結晶結合能を有する不凍タンパク質を混入する必要があるが、能力の弱い植物由来のものは効果が期待できない。これに対して、魚類由来の不凍タンパク質には充分な効果が期待できる。しかし、今まで不凍タンパク質が見いだされている魚種は、極緯度地方あるいは寒帯域に生息する魚種がほとんどであり、温帯域である日本近海で大量に漁獲され、あるいは食品スーパーなどで大量に販売・廃棄される魚種から不凍タンパク質を分離、精製し、この不凍タンパク質を利用することが望まれていた。

また、魚類由来の不凍タンパク質の精製物を冷凍食品などに用いる場合には、精製物に魚特有の臭いが付着することを防止する必要があるが、このための魚体の保管方法や精製法についての研究はほとんど進んでいない。

### 【0004】

#### 【発明の課題】

したがって、本発明の課題は、日本近海等で大量に漁獲され、あるいは食品スーパーなどで大量に販売・廃棄される魚種から新たな不凍タンパク質を見いだすことであり、また、これらから不凍タンパク質を大量に生産するとともに、魚臭の付着を防止して、その利用の促進を図ることである。

### 【0005】

#### 【課題を解決するための手段】

かかる状況において、本発明者は、日本、あるいは日本周辺で漁獲される魚種の体液成分について鋭意研究を行っていたところ、意外にも温帯域である日本あるいは日本周辺で漁獲される魚種であっても、特に冬季に漁獲されるものの中には、不凍タンパク質を有するものがあることを初めて見いだした。本発明者はこれまでに不凍タンパク質の存在が報告された例の無い魚種であるギスカジカ、ツマグロカジカ、トゲカジカ、ナメヨコスジカジカ、キヌカジカ、チカ、イシカリワカサギ、シシャモ、キタノホッケ、ヤナギノマイ、ニシン、マガレイ、スナガレイ、クロガシラガレイ、コガネガレイ、クロガレイ、サメガレイ、ソウハチ、ババガレイ、アサバガレイ、ヌマガレイ、イシガレイ、ムシガレイ、マダラ、スケトウダラ、イカナゴ、シワイカナゴ、マアジ、シチロウウオ、ニシキギンポ、ガジ、ナガガジ、ドロギンポ、ムロランギンポ等の様々な魚種の組織液および筋肉をすりつぶした液、および食品スーパーなどで乾製品として売られているスケトウダラ、コマイ、シシャモ、カラフトシシャモ、ニシン、イカナゴ、コガネガレイ、ウルメイワシなどの魚肉乾製品を粉碎して水を加えた液のなかに、ダイヤモンド型の氷結晶を生成する成分があることを確認して、本発明を完成させるに至ったものである。なかでもワカサギは淡水魚であり、ダイヤモンド型氷結晶を生成する不凍タンパク質が淡水魚に見出された例はこれまでに報告が無いものである。また、さらに、魚類由来の不凍タンパク質の問題点である魚臭の付着についても、新しい精製法を確立して、該問題点を解消したものである。

### 【0006】

すなわち、本発明は、以下のとおりのものである。

(1) 日本国内またはその周辺の水域、若しくは該水域と同等気候の水域に生息する魚種から採取されたものであって、凍結を阻害する機能を有するタンパク質。

(2) タンパク質の採取源がギスカジカ属 (*Myoxocephalus*)、ツマグロカジカ属 (*Gymnophanthis*)、ヨコスジカジカ属 (*Hemilepidotus*)、サラサカジカ属 (*Furcina*)、ワカサギ属 (*Hypomesus*)、シシャモ

10

20

30

40

50

属 (*Spirinchus*)、カラフトシシャモ属 (*Mallotus*)、ホッケ属 (*Pleurogrammus*)、メバル属 (*Sebastes*)、ニシン属 (*Clupea*)、マコガレイ属 (*Limanda*)、クロガレイ属 (*Liopsetta*)、サメガレイ属 (*Clidoderma*)、ゾウハチ属 (*Cleisthenes*)、ババガレイ属 (*Microstomus*)、シュムシュガレイ属 (*Lepidopsetta*)、ヌマガレイ属 (*Platichthys*)、イシガレイ属 (*Kareius*)、ムシガレイ属 (*Eopsetta*)、マダラ属 (*Gadus*)、スケトウダラ属 (*Theragra*)、イカナゴ属 (*Ammodytes*)、シワイカナゴ属 (*Hopopterychus*)、マアジ属 (*Trachurus*)、シチロウウオ属 (*Brachyopsis*)、ニシキギンポ属 (*Pholis*)、オキカズナギ属 (*Ophisthœctrus*)、ナガガジ属 (*Zoarces*)、ドロギンポ属 (*Ascoldia*)、またはムロランギンポ属 (*Pholidapus*)に属する魚種である上記(1)に記載のタンパク質。

(3) タンパク質の採取源がギスカジカ (*Myoxocephalus stelleri tilesii*)、ツマグロカジカ (*Gymnophanthurus herzensteini* Jordan et Starks)、トゲカジカ (*Myoxocephalus polyacanthocephalus* (Pallas))、ナメヨコスジカジカ (*Hemilepidotus jordani* Bean)、キヌカジカ (*Furcina osimae* Jordan et Starks)、チカ (*Hypomesus pretiosus* japonicus (Brevoort))、イシカリワカサギ (*Hypomesus olidus* (Dallas))、シシャモ (*Spirinchus lanceolatus* (Hikita))、カラフトシシャモ (*Mallotus villosus* (Muller))、キタノホッケ (*Pleurogrammus monopterygius* (Pallas))、ヤナギノマイ (*Sebastes steindachneri* Hilgendorff)、ニシン (*Clupea pallasii* Valenciennes)、マガレイ (*Limanda herzensteini* Jordan et Snyder)、スナガレイ (*Limanda punctatissima* (Steindachner))、クロガシラガレイ (*Limanda schrenkii* Schmidt)、コガネガレイ (*Limanda aspera* (Pallas))、クロガレイ (*Liopsetta obscura* (Herzenstein))、サメガレイ (*Clidoderma aspernum* (Temminck et Schlegel))、ゾウハチ (*Cleisthenes pinetorum* herzensteini (Schmidt))、ババガレイ (*Microctomus achne* (Jordan et Starks))、アサバガレイ (*Lepidopsetta mochigarei* Snyder)、ヌマガレイ (*Platichthys stellatus* (Pallas))、イシガレイ (*Kareius bicoloratus* (Basslewsky))、ムシガレイ (*Eopsetta grigorjewi* (Herzenstein))、マダラ (*Gadus macrocephalus* tilesii)、スケトウダラ (*Theragra chalcogramma* (Pallas))、イカナゴ (*Ammodytes personatus* Girard)、シワイカナゴ (*Hopopterychus dybowskii* Steindachner)、マアジ (*Trachurus japonicus* (Temminck et Schlegel))、シチロウウオ (*Brachyopsis rostratus* (Tilesius))、ニシキギンポ (*Pholis picta* (Kner))、ガジ (*Ophisthœctrus ocellatus* (Tilesius))、ナガガジ (*Zoarces elongatus* Kner)、ドロギンポ (*Ascoldia variiegata knipowitschi Soldatov*)、またはムロランギンポ (*Pholidapus dybowskii* (Steindachner))に属する魚種である(2)に記載のタンパク質。

(4) 魚体乾物から得られたものである上記(1)～(3)のいずれかに記載のタンパク

10

20

30

40

50

## 質

(5) 不凍タンパク質の採取源となる魚体の臭いを除去しながら不凍タンパク質を回収する方法であって、下記1)～5)の工程を含むことを特徴とする不凍タンパク質の回収方法。

- 1) 魚体すり身または魚体乾物粉碎物の懸濁液を調製する工程。
- 2) 魚体すり身または魚体乾物粉碎物の懸濁液を遠心分離し、上澄液を得る工程。
- 3) 上澄液を加熱処理する工程。
- 4) 3)により生じた沈殿物を遠心分離により除去して不凍タンパク質を含有する上澄液を得る工程。
- 5) 4)で得られた上澄液から不凍タンパク質を回収する工程。

10

## 【0007】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

北極、南極あるいはその近海などの局地や深海に生息する魚類の体液は、温度がマイナス2℃程度まで下がっても凍結しない。これに対して普通の魚の体液はマイナス0.8℃で凍結する。なお、海水はマイナス1.9℃で凍結する。

北極、南極等に生息する魚類の体液の不凍性は、これら魚類が自ら生産する不凍タンパク質あるいは不凍糖蛋白質（A F G P）に起因するものであることが明らかになっている。このうち不凍タンパク質には、4つのタイプのタンパク質があり、それぞれ分子量約3,000～4,500のA F P I、分子量約20,000のA F P I I、分子量約7,000のA F P I I I、および分子量約11,000のA F P I Vに分類されている。A F G Pの分子量は2,200から33,000の間である。精製されたタンパク質がA F G Pであるか否かはシップ試薬などを用いることで容易に確認することが出来る。不凍タンパク質は各々、タンパク質のアミノ酸組成およびその高次構造において差異があり、また、同一タイプに分類されているものであっても、魚種によりタンパク質のアミノ酸配列および高次構造はそれ相違する。

20

## 【0008】

一方、不凍タンパク質の機能について述べると、通常の場合、氷晶は、水溶液中において冰核が表れると、まず扁平な六角の板状に成長する。板状平面に対し垂直方向への成長は、板状平面方向に対する成長に比べ100倍程度遅い。これに対して、水溶液中に不凍タンパク質が存在すると円盤平面方向への氷晶の成長は阻止され、最初に形成された板状体を基底面として、この基底面に対して垂直方向に、順次、より小さい板状体が積み重ねられていき、最終的にはピラミッドを二つ重ねたバイピラミッド型の氷晶にゆっくりと成長していく。

30

## 【0009】

したがって、注目する魚種検体から採取した水溶液中に不凍タンパク質が存在している場合に限り、検体液を零度C以下にした場合、その検体液中には図1A、Bに示すようなバイピラミダル氷結晶、結晶学的には六方両錐体（図1A）や偏四角面体（図1B）と呼ばれる氷結晶が顕微鏡下に観測される。不凍タンパク質が有する氷結晶上の12枚の氷層平面に特異的に結合する能力の結果として、このようなバイピラミダル型氷結晶が生成する。零度C以下の凍結温度域において、微視的には、検体液中の不凍タンパク質が互いに結びつかない無数のバイピラミダル氷結晶を生成している。このことが、巨視的には、検体の非凍結現象（不凍活性）として観測される。この現象は、浸透圧計（オスモメーター）を用いることにより検体液の凝固点降下あるいは温度ヒステリシスとして定量化することもできる。凝固点降下の測定法を用いて不凍タンパク質の存在を見出しその活性を評価する為には、高純度の精製不凍タンパク質水溶液を得る必要がある。これに対してバイピラミダル氷結晶観測による不凍活性評価法は、不凍タンパク質さえ存在していれば、たとえ検体液に多量の不純物、共雑タンパク質、イオンなどが混在していても観測される。また、不凍タンパク質の濃度が0.1mM以上であれば濃度によらずバイピラミダル氷結晶が観測される。したがって、検体すなわち注目する魚種が不凍タンパク質を有するかいなかを評価する為のもっとも簡便で迅速な手法は、検体液のバイピラミダル氷結晶を観測する

40

50

ことということができる。

#### 【0010】

本発明の不凍タンパク質の採取源とした魚種においては、凍結温度においていずれも、その血液、すり身、あるいは乾物の検体液中にバイピラミダル氷結晶の存在が確認されている。

本発明において、日本国内またはその周辺の水域に生息する多様な魚種から不凍タンパク質を見いだしたことは画期的なものであって、この結果からみて、北半球、南半球を問わず、少なくとも上記水域と同等な気候を有する水域において生息するものにおいては不凍タンパク質を生体内で合成する能力を有する魚種があるという蓋然性は極めて高い。本発明の魚種の漁獲時期は10月下旬から5月上旬が望ましく、冬季12月から4月上旬が特に好ましい。これらの魚種から不凍タンパク質を得るには、例えば、本発明の魚種の血液、魚肉のすり身および乾製品の水性抽出液から、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltrationクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等の通常のタンパク質の分離精製手段を適宜組み合わせて行うことができる。

#### 【0011】

一般的には、魚体中のタンパク質は魚体の死後直ちに酵素等によって分解され、能力を失ってしまう場合が多いと考えられるため、不凍タンパク質が、食品スーパー等で売られているような死後長時間を経過した魚体からでも精製できることは驚くべきことである。本発明において、食品スーパー等で売られている魚体からでも充分に不凍タンパク質が精製できるという事実を見出し、さらに、加熱、洗浄、乾燥などの処理を経た魚体乾物の製品からでさえも、不凍タンパク質を精製できることを見出したことも、また非常に画期的と言える。これらの事実は、魚類由来の不凍タンパク質が非常に高い安定性を有することに基づいており、このまれな性質のために、不凍タンパク質を魚体すり身あるいは魚体乾物粉碎物の懸濁液から精製する工程において、高温の加熱処理を適用することができる。魚の放つ不快な臭いは、頭部と腹部にある臓器およびそれらの内容物の時間経過に伴う腐敗と、魚肉それ自体が固有に有する臭いに起因している。したがって、不凍タンパク質精製の原材料となる魚体においては、基本的には、これの頭部と腹部を早期に取り除いておくことが望ましい。この腹部と頭部を除去後の魚体は、これを冷蔵して保管する以外にも、乾燥させて保管することが可能である。この乾燥には、不凍タンパク質を濃縮する効果や、細菌の繁殖を抑制する効果があり、また、保管する際の魚体重量を軽減するなどの点で有益である。また、乾燥は、室温における保管を可能にするため、貯蔵、輸送、海外への輸出などの点で有益である。

#### 【0012】

本発明においては、上記通常用いられているタンパク質の分離精製法を適用して不凍タンパク質を得てもよいが、魚臭がなく食品添加物として好適な不凍タンパク質を得るために、1) 魚体すり身あるいは魚体乾物の懸濁液を調製する工程、2) 魚体すり身あるいは魚体乾物の懸濁液を遠心分離し、上澄液を得る工程、3) 上澄液を熱処理する工程、4) 3) により生じた沈殿物を遠心分離により除去して不凍タンパク質を含有する上澄液を得る工程、5) 及び4で得られた上澄液から不凍タンパク質を回収する工程を順次含む、不凍タンパク質の精製法を用いるのが有効である。

すなわち、1) の工程においては魚肉をすり身にし、あるいは魚体乾物をハサミなどで細かく切断した後にミキサーなどにより粉碎し、これに対して水、あるいは重炭酸アンモニウムあるいはリン酸水素ナトリウム等の水溶液を加え魚肉の懸濁液とする。これにより、不凍タンパク質は、水性液中に溶出される。魚肉すり身は、魚肉を細切りにした後ミキサーにかけて得てもよいが、常法によりすり身製造機により擂潰して得てもよい。2) の工程においては、上記すり身懸濁液あるいは魚体乾物粉碎物の懸濁液を遠心分離し、不凍タンパク質を含有する上澄液を得る。遠心分離の条件は、3,000から12,000回転/分で、5分間から60分間である。

#### 【0013】

この後、3) の工程として、上記工程で得られた上澄液を加熱処理するが、加熱処理は、

魚体およびすり身特有の臭いに対して、これを効果的に除去あるいは減少させるとともに、不凍タンパク質以外の共雑タンパク質を熱変性させ沈殿させるものである。このため加熱処理で設定する温度は、目的精製物である不凍タンパク質を変性・沈殿させないのであれば、100度C以下の温度域で高ければ高いほど良いと言える。ギスカジカ、トゲカジカ、ツマグロカジカ、ナメヨコスジカジカ、キヌカジカの不凍タンパク質は特に熱に強いため、これらのすり身懸濁液に対しては、90度Cの加熱処理を10分間行うことでニオイのない不凍タンパク質成分を得ることができた。これらの魚種を用いる場合には70度Cから98度Cの温度範囲で10分間から30分間の加熱処理が好ましい。

## 【0014】

一方、チカ、イシカリワカサギ、シシャモ、キタノホッケ、ヤナギノマイ、ニシン、マガレイ、スナガレイ、クロガシラガレイ、コガネガレイ、クロガレイ、サメガレイ、ソウハチ、ババガレイ、アサバガレイ、ヌマガレイ、イシガレイ、マダラ、スケトウダラ、イカナゴ、シワイカナゴ、マアジ、シチロウウオ、ニシキギンポ、ガジ、ナガガジ、ドロギンポ、ムランギンポについては、50度Cから70度Cの範囲で、10分間から30分間の熱処理工程を行ったが、この温度でも魚の臭いが除去された60%以上の純度の不凍タンパク質精製標品を得ることができた。この純度の不凍タンパク質精製標品は用途によつては充分な品質といえる。4)の工程においては、上記加熱処理した上澄液を遠心し、沈殿した共雑タンパク質を除去する。得られた不凍タンパク質を高濃度で含有する上澄み液は、そのままの形態で後記する用途に用いてもよいが、好ましくは、凍結乾燥により乾燥粉末とする。

10

## 【0015】

本発明の不凍タンパク質は、前述したように、不凍タンパク質には氷の再結晶化を妨げるはたらきがあるため、上記各魚種から得られた不凍タンパク質がA F P I ~ I Vのどのタイプの不凍タンパク質に分類されるか否かに関わらず、氷の再結晶化防止剤ないしは凍結阻害剤として使用でき、例えはアイスクリームあるいは冷凍食品などに混入することによりその品質を持続させるために使用できる。また、この品質維持効果は、食肉、野菜、細胞（卵子や精子）、組織、臓器などを長期凍結保存する際にも同様に期待できる。さらにも、近年、エネルギー密度が大きい氷スラリーを熱媒体として使用する冷熱供給システムあるいは冷熱蓄熱等が提案されているが、これらにおいては、氷の再結晶による配管系の閉塞の問題があり、本発明の不凍タンパク質は氷の再結晶化を有効に防ぐものであるから、この問題を解決するために有望な手段となりうる。このほか不凍蛋白質をコードする遺伝子を植物体に組み込むことにより、その植物に耐寒性を持たせることも応用技術として期待できる。

20

30

以下、本発明の実施例を示すが、本発明は特にこれにより限定されるものではない。

## 【0016】

## 【実施例1】

## &lt;不凍タンパク質存在の確認&gt;

## (1) 検体試料

不凍タンパク質の採取源として使用した魚種は以下のとおりである。

ギスカジカ (*Myoxocephalus stelleri tilesius*、英名 *Frog Sculpin*) :

40

利尻島沿岸で漁獲。

ツマグロカジカ (*Gymnophanthurus herzensteini jordan et Stark*s、英名 *Black edged sculpin*) : 利尻島沿岸で漁獲。

トゲカジカ (*Myoxocephalus polyacanthocephalus* (*Pallas*)、英名 *Great Sculpin*) : 北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別I藤富水産、及び北海道野付漁業協同組合より購入。

チカ (*Hypomesus pretiosus japonicus* (Brevoo

50

r t ) ) :

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産、及び北海道野付漁業協同組合より購入。

ナガガジ(Zoarces elongatus Kner、英名Notched-fin eel pout):

北海道野付漁業協同組合より購入。

イシカリワカサギ(Hypomesus olidus(Dallas)、英名Freshwater smelt):

札幌市北区茨戸公園茨戸川ワカサギ釣り場より購入。

### 【0017】

マガレイ(Limanda herzensteini Jordan et Snyder、英名Brown Sole):

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産より購入。

スナガレイ(Limanda punctatissima (Steindachner)、英名Longsnout flounder):

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産より購入。

クロガレイ(Liposetta obscura (Herzenstein)、英名Black plaice):

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産より購入。:

サメガレイ(Clydodema asperrum (Temminck et Schlegel)、英名Roughscale sole):

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産より購入。:

ゾウハチ(Cleisthenes pinetorum herzensteini (Schmidt)、英名Pointthead flounder):

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産より購入。

### 【0018】

ババガレイ(Microstomus achne (Jordan et Stark)、英名Slime flounder):

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産より購入。

アサバカレイ(Leptopsetta mochigarei Snyder、英名Dusky Sole):

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産より購入。

ムシガレイ(Eopsetta grigorjewi (Herzenstein)、英名Shot hole halibut):

北海道石狩湾の沿岸で漁獲。

マダラ(Gadus macrocephalus Tillessius、英名Pacific cod):

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ(CowBoy)厚別  
1藤富水産より購入。

ナメヨコスジカジカ(Hemilepidotus jordani Bean、英名Yellow Sculpin):

北海道様似町の沿岸で漁獲。

シワイカナゴ(Hypoptichus dybowskii Steindachne 50

r、英名Naked sand lance) :

北海道利尻島沿岸で漁獲。

ドロギンボ (*A sc o l d i a v a r i e g a t a k n i p o w i t s c h i S o l d a t o v*) :

北海道様似町の沿岸で漁獲

【0019】

スケトウダラ (*T h e r a g r a c h a l c o g r a m m a* (P a l l a s)、英名 Wall eye Pollack) :

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別  
1藤富水産より購入。 10

キタノホッケ (*P l e u r o g r a m m u s m o n o p t e r y g i u s* (P a l l a s)、英名Atka mackerel) :

北海道石狩湾の沿岸で漁獲。

ヤナギノマイ (*S e b a s t e s s t e i n d a c h n e r i H i l g e n d o r f*) :

北海道石狩湾の沿岸で漁獲。

ニシン (*C l u p e a p a l l a s i i V a l e n c i e n n e s*、英名Callifornia herring) :

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別  
1藤富水産より購入。 20

シシャモ (*S p i r i n c h u s l a n c e o l a t u s* (H i k i t a)、英名Sishamo Smelt) :

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別  
1藤富水産より購入、及び北海道鵡川町の沿岸で漁獲。

クロガシラガレイ (*L i m a n d a s c h r e n k i S c h m i d t*、英名Cresthead flounder) :

北海道石狩湾の沿岸で漁獲。

スマガレイ (*P l a t i c h t h y s s t e l l a t u s* (P a l l a s)、英名Starry flounder) :

北海道石狩湾の沿岸で漁獲。 30

【0020】

コガネガレイ (*L i m a n d a a s p e r a* (P a l l a s)、英名Yellowfin sole) :

北海道石狩湾の沿岸で漁獲。

イシガレイ (*K a r e i u s s b i c o l o r a t u s* (B a s i l e w s k y)、英名Stone flounder) :

北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別  
1藤富水産より購入、及び北海道石狩湾の沿岸で漁獲。

キヌカジカ (*F u r c i n a o s i m a e J o r d a n e t S t a r k s*、英名Silk Sculpin) :

北海道苦小牧の沿岸で漁獲。 40

イカナゴ (*A m m o d y t e s p e r s o n a t u s G i r a r d*、英名Japanese sand lance) :

北海道石狩湾の沿岸で漁獲。

ムロランギンボ (*P h o l i d a p o u s d y b o w s k i i* (Steindachner)、英名Dybowsky's gunnel) : 北海道石狩湾の沿岸で漁獲。

シチロウウオ (*B r a c h y o p s i s r o s t r a t u s* (T i l e s i u s)、英名Longsnout poacher) : 北海道野付湾で漁獲。

ニシキギンボ (*P h o l i s p i c t a* (Kneer)、英名Painted gunnel) : 北海道野付湾で漁獲。 50

ガジ (*Opisthocentrus ocellatus* (*Tilesius*))、英名 Red spotted gunnel : 北海道野付湾で漁獲。

カラフトシシャモ (*Mallotus villosus* (*Muller*))、英名 Atlantic capelin : 北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別1藤富水産より購入。

マアジ (*Trachurus japonicus* (*Temminck et Schlegel*))、英名 Yellowfin horse mackerel : 北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別1藤富水産より購入。

### 【0021】

10

不凍タンパク質の採取源として使用した魚体乾物の製品は以下のとおりである。

スケトウダラ (商品名: むしりたら、製造元: 大東食品) 北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別1より購入。

シシャモ (商品名: 国内産姫シシャモ、製造元: 大丸水産) 北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別1より購入。

イカナゴ (商品名: おおなご薰製、製造元: 藤水) 北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別1より購入。

コガネガレイ (商品名: ロール黄金かれい、製造元: 大東食品) 北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別1より購入。

ウルメイワシ (商品名: うるめ煮干、製造元: かね七) 北海道札幌市厚別区厚別西4条2丁目752番地318カウボーイ (CowBoy) 厚別1より購入。

20

### 【0022】

30

#### (2) バイピラミタル氷結晶の観察

a) 上記各魚種のうちの鮮魚について、鰓 (エラ) 部をこじ開けて肝臓、小腸などの器官を傷つけないよう薬匙 (さじ) 等で抑えながら、頭部側に見える三角形様の赤黒い心臓部に注意深く容量 5 ml の注射器につけた注射針をさし込み血液を採取した。血液の採取量の合計はギスカジカ、ツマグロカジカ及びチカの各魚種において、各々 150 ml であり、また、トゲカジカにおいて 420 ml、キタノホッケ、ニシンにおいて 30 ml であった。また、マガレイ、スナガレイ、クロガレイ、サメガレイ、ババガレイ、アサバガレイ、クロガシラガレイ、ヌマガレイ、コガネガレイ、イシガレイ、ムシガレイにおいて各々 20 ml、マダラ、スケトウダラにおいて 35 ml、ナメヨコスジカジカ、キヌカジカ、ナガガジ、ドロギンボ、ムロランギンボにおいては 25 ml であった。これらを以下 (b) 及び実施例 2 の試験に用いた。また、上記以外の鮮魚のイシカリワカサギ、ヤナギノマイ、ソウハチ、シシャモ、カラフトシシャモ、シワイカナゴ、イカナゴ、シチロウウオ、ニシキギンボ、ガジについて、皮、骨、内臓を除いた魚肉部分を包丁により切り出し細かく切り刻んだ後ミキサーにかけて粉碎したものをすり身とした。すり身 20 ml に対して 0.1 M 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 7.9) を等量 (20 ml) 加えて懸濁した。さらに、スケトウダラ、シシャモ、イカナゴ、コガネガレイ、ウルメイワシ、マアジの魚体乾製品について、ハサミを用いて 1 cm 程度に切り刻んだ後、ミキサーにかけて粉碎し、粉碎物重量 20 g に対して 20 ml の 0.1 M 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 7.9) を加えて良く混合し、これを 4 度 C 下で一晩静置したものを乾物の懸濁液とした。こうして得られた血液、すり身懸濁液、および乾物懸濁液を以下 (b) 及び実施例 2 の試験に用いた。

30

40

### 【0023】

なお、注目する検体液が不凍タンパク質を含むか否かの評価は、わずか 1 ul の液に対しても低温顕微鏡下でのバイピラミタル氷結晶観察実験をすることで行い得る。

b) 上記のように採取した各魚種の血液それぞれ 1 ul をライカ社製 DMLB 100 型顕微鏡 (Leica DMLB 100 photomicroscope) の直径 16 mm のカバーガラス上に滴下した。これをそのままもう 1 枚の直径 12.5 mm のカバーガラスによりはさみ、これを DMLB 100 型顕微鏡のステージ部に設置した冷却箱内にセ

50

ットした。冷却箱の上下には直径 1 mm の光取り入れ穴をあけ、顕微鏡光源からの光は下側の穴から箱内を通り上側の穴を抜けてレンズに入光させるようにした。この上下の穴により規程される光軸上に検体液をセットすることで、光軸上にある検体液中の物質を顕微鏡観察することができる。検体液がセットされた冷却箱の中の温度は、リンカム社製 LK 600 温度制御装置 (LK 600 温度コントローラー) により +/− 0.1 度 C の誤差で制御される。室温下で検体液をセットした後、温度制御装置により冷却箱内の温度を毎秒 0.2 度 C でマイナス 22 度 C まで下降させた。およそマイナス 1.4 度 C からマイナス 2.2 度 C の間の温度のどこかで検体液の全体が凍結する。凍結の後に毎秒 0.1 度 C で冷却箱内温度を上昇させ零度 C で上昇を停止し、そのまま 1 秒 - 10 秒程度の間、零度 C を維持していると凍結が溶け、無数のきれつの入った氷結晶状態を経たのちに、数えられる程度の氷結晶つぶが水中に浮かんだものが観測された。その瞬間に、冷却箱内の温度をマイナス 0.1 度 C ～マイナス 1.0 度 C 程度に下降させて止め、氷結晶の形状を観察した。観察結果を図 2 ～ 図 8 に示す。試験に使用した魚種のいずれにおいてもバイピラミダル型の氷晶が観察され、これら魚種は、いずれも不凍タンパク質を有することを確認した。また、魚肉すり身懸濁液 1 μl、および乾物懸濁液 1 μl を用いて同様の試験を行ったが、これらの試験においても、すべての魚種について、バイピラミダル型の氷晶が観察された。

## 【0024】

## 【実施例 2】

## (不凍タンパク質の分離精製 1)

## a) 不凍タンパク質の精製

実施例 1 の (2) a) と同様にしてギスカジカから血液 30 ml をプラスチック試験管に採取した。プラスチック試験管内に採取したギスカジカ血液 30 ml を 4 度 C の冷蔵チャンバー内に一晩放置し血球成分だけを凝血・沈殿（一般にクロッティング (clotting) 操作と呼ぶ）させた。血液 30 ml 中およそ半分 (15 ml) が血球として沈殿し、上澄みの血清 15 ml だけを分取した。このとき濃縮遠心機を用いて 3000 回転、15 分間の遠心操作を行い血球と血清の分離能を向上した。このとき、分取した 15 ml の血清にバイピラミダル氷結晶を観測し不凍タンパク質の存在を確認した。この 15 ml の血清を内径 2.5 cm 高さ 9.6 cm (容量 47.5 ml) の Sephadex G-50 ゲルカラムクロマトグラフィーによりゲル通過した。溶出液として 0.1 M の硫酸アンモニウム水溶液 (pH = 7.9) を用いた。図 9 に、血清のゲル通過分画に対する 280 nm 紫外吸収パターンを示す。試験管 1 本あたりに 10 ml ずつのゲル通過分画を得た。つぎにそれらを凍結乾燥した。

## 【0025】

各分画の凍結乾燥物に対して 0.5 から 2 ml の 0.1 M の硫酸アンモニウム水溶液 (pH = 7.9) を加えた後、各々に対してバイピラミダル氷結晶の観測をおこない、不凍タンパク質が含まれている 10 番から 24 番までの分画（図 9 の影をつけた部分 : Anti-freeze Active Fractions）を次の精製ステップに用いた。10 番から 24 番までの分画を約 4.5 ml の硫酸アンモニウム水溶液 (pH = 7.9) に溶解したものに対して、ミリポア社の Amicon セントリプレッパーを用いて不凍タンパク質を含む分子量 3 万以下のタンパク質水溶液約 4.0 ml を得た。これに対して 0.1 M 硫酸アンモニウム水溶液 (pH = 7.9) で平衡化したファルマシア社製 DEAE セファロース CL-6B 陰イオン交換樹脂 5 ml を加え、濃縮遠心機により 3000 回転で 1 分間遠心して、この陰イオン樹脂に対して非結合性をもつ不凍タンパク質水溶液約 4.0 ml を得た。この水溶液に対して 0.1 M 硫酸アンモニウム水溶液 (pH = 7.9) で平衡化したファルマシア社製 CM セファロース CL-6B 陽イオン交換樹脂 5 ml を加え、濃縮遠心機により 3000 回転で 1 分間遠心して、この陽イオン交換樹脂に対しても非結合性をもつ不凍タンパク質水溶液を得た。

## 【0026】

この試料を凍結乾燥した後に少量の 0.1 M 硫酸アンモニウム水溶液 (pH = 7.9) で

10

20

30

40

50

溶解し、ODS(C8)カラムを用いた逆相HPLCクロマトグラフィーで分画した。HPLC経路内とカラムの平衡化は0.1%のトリフルオロ酢酸水溶液(A液)を用いて行い、溶出は0.1%のトリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル(B液)を用いた。B液の濃度勾配を毎分1%の直線的上昇に設定し1ml/minの送液速度に設定した。図10にこの逆相HPLCのパターンを示す。図10に観測された各ピークを集め凍結乾燥した後に、各々を少量の0.1M硫酸アンモニウム水溶液(pH=7.9)で溶解しバイピラミダル氷結晶生成の有無を検査した。その結果、AFP1は、図1Bで示される偏四角面体の氷結晶を生成し、一方AFP2は図1Aで示される六方両錐体の氷結晶を生成することが判明した。こうして、 AFP1と AFP2の記号を付した2つのピーク分画の凍結乾燥物を精製不凍タンパク質粉末として取得した。

これら2つが異なる不凍タンパク質であることは、以下に示す電気泳動によっても確かめられた。

#### 【0027】

##### b) ゲル電気泳動

ギスカジカ由来AFP1とAFP2についてのSDSゲル電気泳動を行った。 AFP1及びAFPの分子量は数千~5万程度と予想されるため、タンパク質を分離良く泳動するために、ゲル中のSDS濃度として16%を選んだ。電気泳動に用いた試薬の組成は下記のとおりである。

##### 分離ゲル (10 ml)

2.0	ml	水
5.4	ml	30%ポリアクリルアミド + 0.8%ビスアクリルアミド
2.5	ml	1.5Mトリス塩酸 (pH=8.8)
120	μl	10%ドデシル硫酸ナトリウム溶液
70	μl	10%過硫酸アンモニウム溶液
15.0	μl	N, N, N', N'-テトラメチレンジアミン溶液

##### 濃縮ゲル (5 ml)

3.17	ml	水
500	μl	30%ポリアクリルアミド + 0.8%ビスアクリルアミド 30%
1.25	ml	0.5Mトリス塩酸 (pH=6.8)
50	μl	10%ドデシル硫酸ナトリウム溶液
30	μl	10%過硫酸アンモニウム溶液
7.5	μl	N, N, N', N'-テトラメチレンジアミン溶液

#### 【0028】

分子量マーカー(図11、Marker1)としてはGIBCO社製たんぱく質分子量スタンダード低分子量用を用いたほか、同類たんぱく質とのサイズ比較のために2量体型不凍タンパク質RD3(分子量14kDa、Marker2)、1量体型不凍タンパク質RD3N1(6.5kDa、Marker3)、ニワトリ卵白リゾチーム(分子量14.3kDa、Marker4)、不凍糖たんぱく質(3kDa、Marker4)を用いた。マーカー以外のたんぱく質は全て7ulの0.1M硫酸アンモニウム水溶液(pH=7.9)で溶解し、これに7ulのbuffer液(0.065M Tris-HCl (pH=6.8), 2% SDS, 10% Sucrose, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% BPP染色試薬)を加えた後に95度Cで5分間煮沸して、電気泳動試料とした。これを日本エイドー社製ミニスラブゲル電気泳動装置を用いて100Vの定電圧下にて2時間の電気泳動を行った。その結果を図11に示す。図に示されるように、 AFP1は分子量約11kDa、 AFP2は分子量3~6kDaの不凍タンパク質であった。これらの分子量からみると、 AFP1は上記のタイプIV(AFP IV)、 AFP2は、タイプI(AFP I)に属するものと推定される。

#### 【0029】

##### 【実施例2】

## {不凍タンパク質の分離精製2}

実施例1の(2)に記述した手順に従って、チカのすり身の懸濁液40m1を調製した。これをプラスチック試験管に入れ、10,000回転で15分間遠心して、約20m1の上澄み液を得た。この上澄み液のタンパク質濃度は約25mg/m1であった。この上澄み液の入っているプラスチック試験管を70度Cの温浴に10分間浸することで加熱処理をおこなった。温浴からプラスチック試験管を取り出した後、直ちに碎いた氷に突き入れて急冷した。その後に、この試料を18,000回転で30分間遠心して、約15m1の上澄み液を得た。この上澄み液のタンパク質濃度は約6.6mg/m1であった。図12に、この上澄み液に対するSDSゲル電気泳動の結果(図12A)とグルカラムクロマトグラフィーの紫外吸収パターン(図12B)を示す。SDSゲル電気泳動は図9と同一条件で行い、グルカラムクロマトグラフィーは200μlの試料溶液をAmersham Pharmacia Biotech Sepharose 6 HR 10/30カラムにより0.2m1/分で溶出することで行った。図12Aの電気泳動図の最右レーンに示されるAFP3(分子量約17kDa)、 AFP4、 AFP5(分子量約14kDa)はいずれも図1Aの形状のバイピラミダル氷結晶を生成するチカ由来の不凍タンパク質であった。これらの分子量から見ると、チカ由来不凍タンパク質はいずれもタイプI I型に属するものと推定される。これらAFP3、 AFP4、 AFP5に相当するグルクロマトグラフィーの分画が図12Bの矢印の範囲で示した部分である。この部分の吸収ピーク強度をのこりの部分と比較することから、70度Cで10分間の加熱処理後の遠心上清を得ることで、約62%の精製度でチカ由来不凍タンパク質が精製できることが示された。

10

20

30

## 【0030】

ギスカジカから得た魚肉すり身懸濁液についても上記と同様に加熱処理工程を含む不凍タンパク質の分離精製及びゲル電気泳動を行ったが、この場合においては主としてタイプIと思われる不凍タンパク質が得られた。この不凍タンパク質は、90度Cの加熱によっても得られることができた。

## 【0031】

## 【実施例3】

## {不凍タンパク質の分離精製3}

実施例1の(2)に記述した手順に従って、シシャモ乾物の懸濁液40m1をプラスチック試験管に採取した。これに0.4m1の99.5%酢酸を加えて良く混合し、4度Cで1時間放置して。この操作により生成した酸性沈殿物を、18,000回転で30分間遠心することにより除去し、約35m1の上澄み液を得た。これに対して0.5m1の1M水酸化ナトリウム水溶液を加えて良く混合し、4度Cで1時間放置した。この操作により生成した塩基性沈殿物を18,000回転で30分間遠心することにより除去し、約32m1の上澄み液を得た。この液に対して上記と同様に加熱処理工程を含む不凍タンパク質の分離精製を行いタイプI Iと思われる不凍タンパク質が得られた。

40

## 【0032】

## 【実施例4】

## {不凍タンパク質の分離精製4}

実施例1の(2)に記述した手順に従って、ナガガジのすり身の懸濁液40m1を調製した。これをプラスチック試験管に入れ、6,000回転で30分間遠心して、約20m1の上澄み液を得た。この上澄み液を、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH=3.7)に対して透析し、共雑タンパク質を凝集させた。これを12,000回転で30分間遠心して取り除き、上澄み液を得た。この上澄み液に対して陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、1m1ずつの溶出液を280nmの吸収を検出しながらフラクションコレクターにより回収した。陽イオン交換クロマトグラフィーにはAmersham Pharmacia BiotechのFPLCシステムとBIO-RADのHigh-Sカラムを用いた。50mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH=3.7)を用いてカラムの平衡化と上澄み液の取り込みをおこない溶出は流速1m1/分で0~0.5Mの塩化ナトリウムの直線勾配をかけることで行った。ここまで操作は全て4度Cで行った。次に、280nmの吸収

50

の観測された試料液を TOSO の HPLC システムと SDS カラムを用いた逆相クロマトグラフィーにより精製した。0.1% のトリフルオロ酢酸を用いてカラムの平衡化と試料液の取り込みを行い、溶出にはアセトニトリルの直線勾配を用いた。溶出試料の吸光度は 214 nm と 280 nm で検出し、単一のタンパク質を含む溶出液フラクションを得た後にこれを凍結乾燥した。この凍結乾燥粉末を 0.1 M の重炭酸アンモニウム水溶液に溶解し、そのバイピラミダル氷結晶の観測をおこなうことで不凍タンパク質であることを確認した。この不凍タンパク質の試料を Asparaginyl endopeptidase および Trypsin で消化し、それについて得られたペプチド断片を再び逆相クロマトグラフィーで回収した。これらのペプチド断片について、Applied Biosystems 社製の 491 Protein Sequencer と 785A Programmable Absorbance Detector、及び 140C Microgradient System から構成されるアミノ酸配列解析装置を用いることにより、アミノ酸配列を決定した。その結果、ナガガジは、互いによく似た配列をもち、65, 66 および 67 残基からなる 3 種のタンパク質を発現する。

これら 3 種の各不凍タンパク質のアミノ酸配列およびその遺伝子の CDS 領域の塩基配列を配列表の配列番号 1 ~ 6 に示す。これらの塩基配列は、既に塩基配列が明らかにされているマクロゾアルケルスアメリカヌス由来のタイプ III 型不凍タンパク質と約 75 ~ 90% の相同性を示した。このようにして、タイプ III 型の不凍タンパク質がナガガジのすり身から精製されることが示された。

#### 【0033】

本発明において使用する魚種の血液、すり身、あるいは乾物懸濁液に対して、実施例 1 の方法で示した精製法を適用して、SDS 電気泳動上で単一バンドになるまでの精製を行い、下記魚種についてタイプ I ~ IV までの不凍タンパク質種類の同定をおこなった結果を以下に示す。

##### a) タイプ I 型

ギスカジカ、ツマグロカジカ、トゲカジカ、ナメヨコスジカジカ、  
キヌカジカ、マガレイ、スナガレイ、クロガシラガレイ、コガネガレイ、  
クロガレイ、サメガレイ、ソウハチ、ババガレイ、  
アサバガレイ、ヌマガレイ、イシガレイ、ムシガレイ

##### b) タイプ II 型

チカ、イシカリワカサギ、シシャモ、カラフトシシャモ、ニシン、  
マアジ、シチロウウオ

##### c) タイプ III 型

ナガガジ、ドロギンポ、ムロランギンポ、ニシキギンポ、ガジ

##### d) タイプ IV 型

ギスカジカ、ツマグロカジカ、トゲカジカ、ナメヨコスジカジカ、  
キヌカジカ

(注. これらはタイプ I 型と IV 型を両方発現している)

##### e) AFGP

マダラ、スケトウダラ

#### 【0034】

##### 【発明の効果】

不凍タンパク質は、上記したとおり、例えばアイスクリーム、冷凍食品等における氷晶の成長による食味劣化、組織破壊を防止し、また、氷スラリーを使用する冷熱供給システムあるいは冷熱蓄熱等において、氷の再結晶による配管系の閉塞を解消し得る有効な添加剤として期待されているものである。さらに卵子や精子、移植臓器等の低温長期保存冷凍保存においても有望な物質である。

しかし、現状では、効力の大きい不凍タンパク質は、極地方に生息する特定の魚種にしか見いだされていないため、大量には生産し得ずその有効利用が妨げられていた。これに対して、本発明の新たな不凍タンパク質は、日本国内、日本近海水域、該水域と同等気候の

10

20

30

40

50

水域に生息する魚種から生産できるので、容易に得られるものであり、不凍タンパク質についての利用促進あるいは不凍タンパク質の応用研究の発展に大いに寄与するものである。

【0035】

【配列表】

### SEQUENCE LISTING

〈110〉 AIST Hokkaido

10

〈120〉 Antifreeze protein from fish

〈130〉 s.tuda0001-0003

〈140〉

〈141〉

〈160〉 6

〈170〉 PatentIn Ver. 2.1

〈210〉 1

20

〈211〉 65

〈212〉 PRT

〈213〉 Zoarces elongatus Kner

〈400〉 1

Gly Gln Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Met Asn Thr Ala Leu

1

5

10

15

Thr Pro Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro

20

25

30

Phe Val Glu Ala Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val

35

40

45

Ala Lys Gly Gln Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly

50

55

60

Lys

65

40

〈210〉 2

〈211〉 195

〈212〉 DNA

〈213〉 Zoarces elongatus Kner

**<220>**

**<221> CDS**

**<222> (1)..(195)**

**<400> 2**

ggc cag tcc gtg gtg gcc acc cag ctg atc ccc atg aat act gcc ctg 48

Gly Gln Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Met Asn Thr Ala Leu

1

5

10

15

10

act ccg gcg atg atg gag ggg aag gtg acc aac cca agc ggc atc ccg 96

Thr Pro Ala Met Met Glu Gly Lys Val Thr Asn Pro Ser Gly Ile Pro

20

25

30

ttc gtg gag gcg tcc caa ata gtg ggg aag caa gtg aac gtg ata gtg 144

Phe Val Glu Ala Ser Gln Ile Val Gly Lys Gln Val Asn Val Ile Val

35

40

45

gct aag ggc caa acc ctc atg cca gac atg gtg aaa acg tac gcg gga 192

Ala Lys Gly Gln Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Thr Tyr Ala Gly

50

55

60

20

aag

195

Lys

65

**<210> 3**

30

**<211> 66**

**<212> PRT**

**<213> Zoarces elongatus Kner**

**<400> 3**

Asn Gln Glu Ser Val Val Ala Ala Val Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1

5

10

15

Leu Thr Val Gly Met Met Thr Thr Arg Val Val Ser Pro Thr Gly Ile

40

20

25

30

Pro Ala Glu Asp Ile Pro Arg Leu Ile Ser Met Gln Val Asn Gln Val  
 35 40 45

Val Pro Met Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Gly Tyr Ala  
 50 55 60

Pro Ala  
 65

10

$\langle 210 \rangle$  4

$\langle 211 \rangle$  198

$\langle 212 \rangle$  DNA

$\langle 213 \rangle$  Zoarcetes elongatus Kner

$\langle 220 \rangle$

$\langle 221 \rangle$  CDS

$\langle 222 \rangle$  (1)..(198)

20

$\langle 400 \rangle$  4

aac cag gag tcc gtg gtg gcc gcc gtt ctg atc ccc ata aat act gcc 48  
 Asn Gln Glu Ser Val Val Ala Ala Val Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala  
 1 5 10 15

ctg act gtg ggg atg atg acg aca cgg gtg gtc tcc cca acg ggc atc 96  
 Leu Thr Val Gly Met Met Thr Thr Arg Val Val Ser Pro Thr Gly Ile  
 20 25 30

ccc gcc cag gac att ccc cga tta atc tca atg caa gtg aac cag gta 144  
 Pro Ala Gln Asp Ile Pro Arg Leu Ile Ser Met Gln Val Asn Gln Val  
 35 40 45

gtg ccg atg ggc aca acc ctc atg cca gac atg gtg aaa ggg tac gcc 192  
 Val Pro Met Gly Thr Thr Leu Met Pro Asp Met Val Lys Gly Tyr Ala  
 50 55 60

ccg gct 198 40  
 Pro Ala

65

⟨210⟩ 5

⟨211⟩ 67

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Zoarces elongatus Kner

⟨400⟩ 5

10

Asn Gln Ala Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1

5

10

15

Leu Thr Leu Val Met Met Lys Ala Lys Val Ala Thr Pro Met Gly Ile

20

25

30

Pro Ala Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Ser Met Gln Val Asn Gln Ala

35

40

45

Val Ala Cys Gly Thr Thr Leu Met Pro Gly Met Val Lys Thr Tyr Thr

50

55

60

20

Pro Val Lys

65

⟨210⟩ 6

⟨211⟩ 201

⟨212⟩ DNA

30

⟨213⟩ Zoarces elongatus Kner

⟨220⟩

⟨221⟩ CDS

⟨222⟩ (1)..(201)

⟨400⟩ 6

aac cag gcg tcc gtg gtg gcc acc cag ctg atc ccc ata aat act gcc 48

Asn Gln Ala Ser Val Val Ala Thr Gln Leu Ile Pro Ile Asn Thr Ala

1

5

10

15

40

ctg act ctg gtg atg atg aag gct aag gtg gcc acc cca atg ggc atc 96  
 Leu Thr Leu Val Met Met Lys Ala Lys Val Ala Thr Pro Met Gly Ile  
 20 25 30  
 ccc gcc gag gac att ccc cga ata gtc tca atg caa gtg aac cag gca 144  
 Pro Ala Glu Asp Ile Pro Arg Ile Val Ser Met Gln Val Asn Gln Ala  
 35 40 45  
 gtg gct tgt ggc aca acc ctc atg cca ggc atg gtg aaa acg tac act 192  
 Val Ala Cys Gly Thr Thr Leu Met Pro Gly Met Val Lys Thr Tyr Thr  
 50 55 60  
 cca gtg aag 201  
 Pro Val Lys  
 65

## 【図面の簡単な説明】

20

【図 1】バイピラミッド型氷結晶の形状を示す模式図である。

【図 2】ギスカジカ、トゲカジカ、ツマグロカジカ、チカ、イシカリワカサギ、及びナガガジの血液において観察されたバイピラミッド型氷結晶の顕微鏡写真である。

【図 3】マガレイ、クロガレイ、スナガレイ、アサバガレイ、サメガレイ、及びゾウハチの血液において観察されたバイピラミッド型氷結晶の顕微鏡写真である。

【図 4】スケトウダラ、キタノホッケ、ヤナギノマイ、ニシン、シシャモ、及びクロガシラガレイの血液、あるいはすり身懸濁液において観察されたバイピラミッド型氷結晶の顕微鏡写真である。

【図 5】ヌマガレイ、コガネガレイ、イシガレイ、キヌカジカ、イカナゴ、及びムロランギンポの血液、あるいはすり身懸濁液において観察されたバイピラミッド型氷結晶の顕微鏡写真である。

【図 6】マダラ、ババガレイ、ナメヨコスジカジカ、ドロギンポ、シワイカナゴ、及びムシガレイの血液、あるいはすり身懸濁液において観察されたバイピラミッド型氷結晶の顕微鏡写真である。

【図 7】ニシキギンポ、ガジ、シチロウウオ、カラフトシシャモのすり身懸濁液において観察されたバイピラミッド型氷結晶の顕微鏡写真である。

【図 8】ウルメイワシ、アジ、スケトウダラ、シシャモ、コガネガレイの乾製品破碎物の懸濁液において観察されたバイピラミッド型氷結晶の顕微鏡写真である。

【図 9】ギスカジカ血清のゲル濾過分画に対し 280 nm 紫外線を照射した場合の吸収パターンを示す図である。

【図 10】上記ゲル濾過分画の 10 番から 20 番についての、逆相 HPLC クロマトグラフィーの溶出パターンを示す図である。

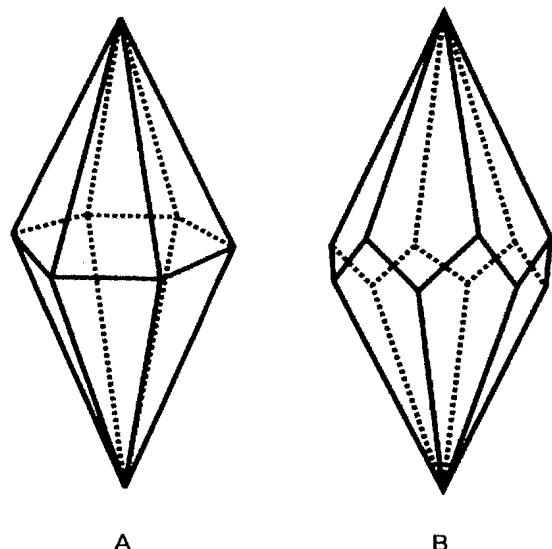
【図 11】この逆相 HPLC クロマトグラフィーにより得られた分画 A F P 1 と A F P 2 についての SDS ゲル電気泳動の結果を示す図である。

【図 12】A. チカのすり身懸濁液に対して 70 度 C で 10 分間の加熱処理前と処理後の遠心上澄についての SDS ゲル電気泳動の結果を示す図である。B. 70 度 C で 10 分間の加熱処理後の試料溶液に対するゲルクロマトグラフィーの溶出パターンを示す図である。

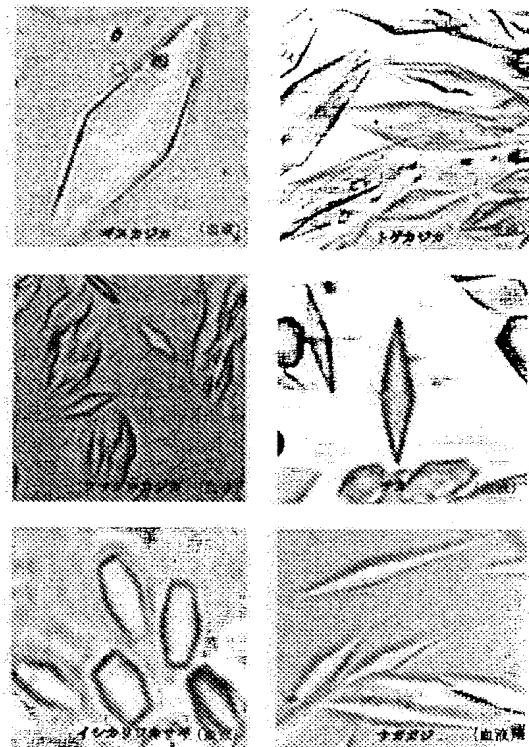
30

40

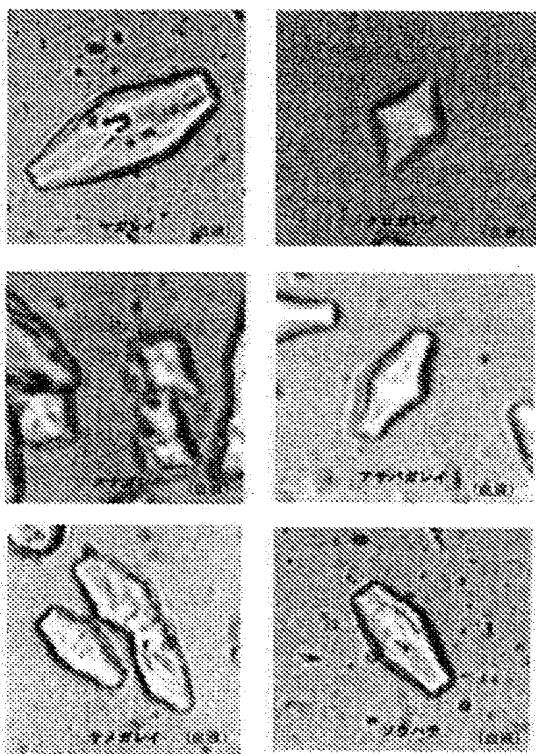
【図 1】



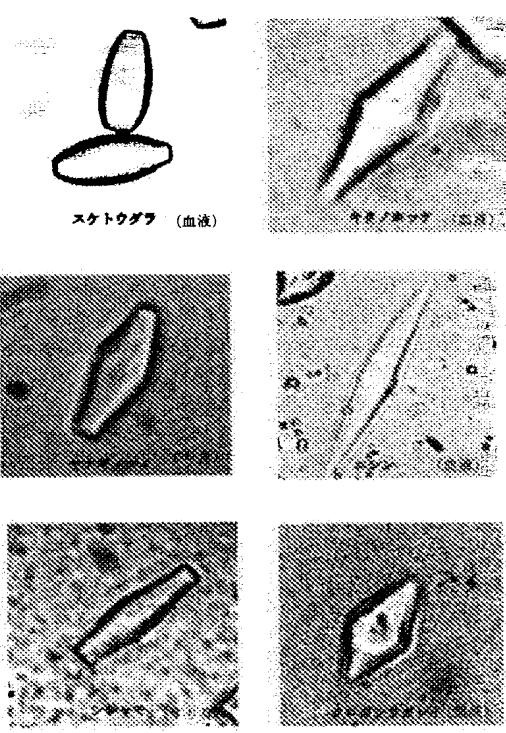
【図 2】



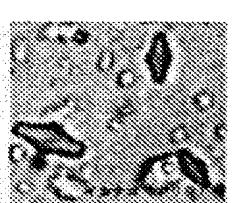
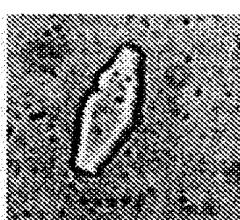
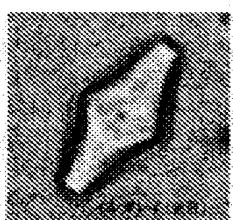
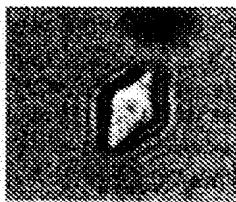
【図 3】



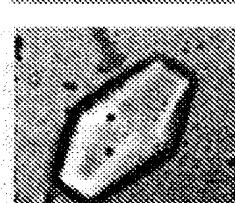
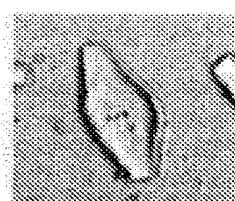
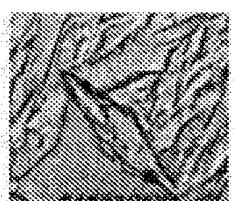
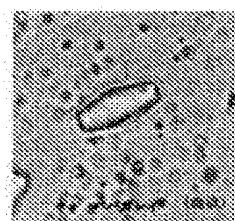
【図 4】



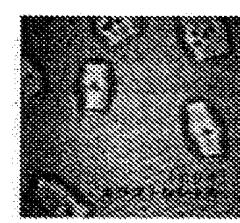
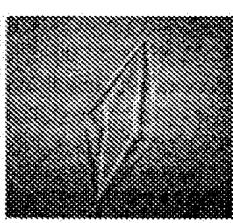
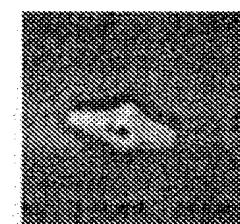
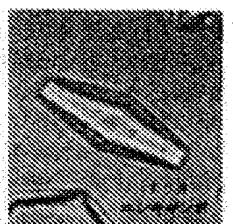
【図 5】



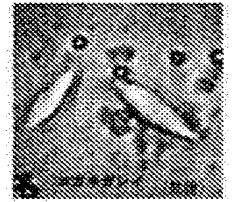
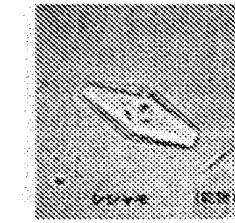
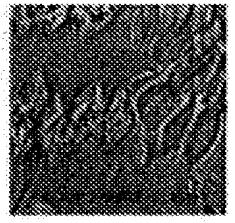
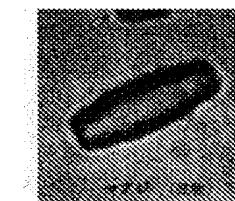
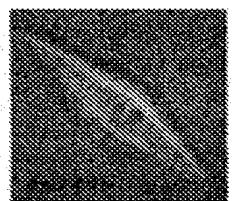
【図 6】



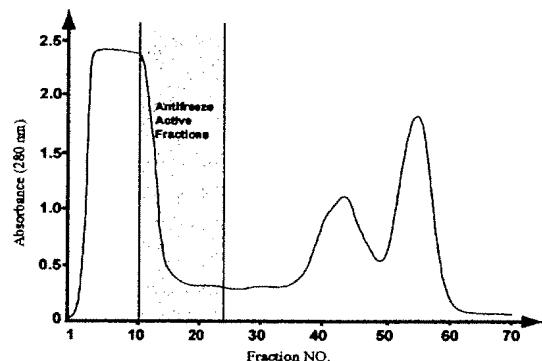
【図 7】



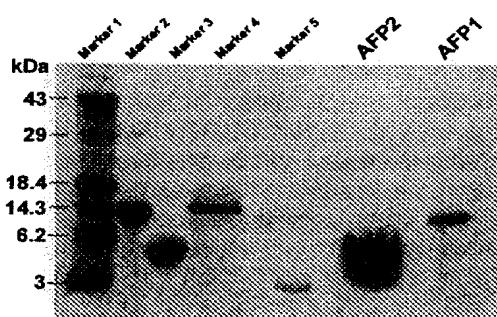
【図 8】



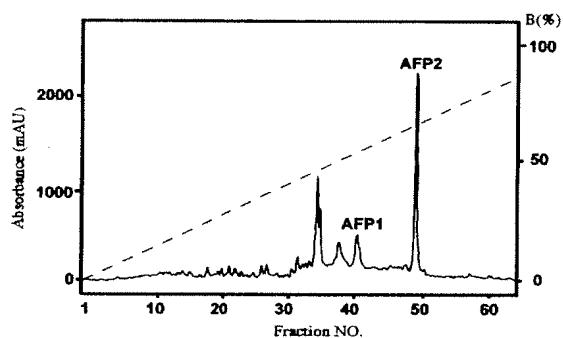
【図 9】



【図 1 1】



【図 1 0】



【図 1 2】

